

Humán IL-10 termelő regulátor B sejtek jellemzése és szerepük vizsgálata Rheumatoid arthritisben

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Bankó Zsuzsanna



Témavezető: Prof. Dr. Sármai Gabriella, egyetemi tanár
ELTE TTK Biológia Doktori Iskola, Immunológia Program
Programvezető: Prof. Dr. Erdei Anna, egyetemi tanár

ELTE TTK, Immunológiai Tanszék 2018

Bevezetés

A B sejtek fő funkciója az aktivációjuk által indukált ellenanyag termelés, ezenkívül pro- és antiinflammatorikus citokinek termelés révén is részt vesznek az immunválasz szabályozásában. A regulator B sejtek (Breg) különböző mechanizmusokon keresztül képesek befolyásolni az autoimmun és a gyulladásos folyamatokat, de legintenzívebben kutatott populációjuk az IL-10 termelő regulátor B sejtek (B10 sejtek). Jelenleg az irodalmi adatok ellentmondásosak a regulátor B sejtek arányáról autoimmun betegségekben. A B sejtek fontos szerepet játszanak a rheumatoid arthritisz (RA) kialakulásában, ami egy krónikus autoimmun betegség. A gyulladásos citokinek közül a tumor nekrosis faktor α (TNF α) az egyik legfontosabb, ami hozzájárul az RA patogeneziséhez. Az ízületekben a gyulladásos folyamatok hosszú távú fennmaradása előidézi azok károsodását. Az anti-TNF terápia széles körben használt az RA kezelésében és egyike a leghatékonyabb terápiáknak, de a pontos hatásmechanizmusa nem teljesen ismert.

Célkitűzések

Doktori munkám során a következő célokat tűztük ki.

1) Mivel az irodalmi adatok ellentmondásosak a regulátor B sejtek indukálására illetve karakterizálására vonatkozóan:

- Elsőként a humán B sejtek IL-10 termelését indukáló optimális stimulus megtalálására törekedtünk.
- Majd ezzel az optimális stimulussal indukált IL-10 termelő sejtek sejtfelszíni karakterizálása következett.
- Kíváncsiak voltunk arra is, hogy a szupresszálo IL-10 mellett gyulladásos citokineket is termelnek-e ugyanazok a B sejtek.
- Mivel a különböző egérmodellekben az IL-21 fokozza a B sejtek IL-10 termelését, ezért megvizsgáltuk, hogy hogyan hat ez a citokin a humán B sejtek IL-10 termelésére.
- Ezek után következett a regulátor B sejtek funkcionális vizsgálata, CD4⁺ T sejtekkel együtt ko-kultúrában vizsgálatuk a regulátor B sejteknek a T sejtek IFN γ termelésére kifejtett hatását.
- Majd intracelluláris festéssel vizsgáltuk, hogy a plazmablaszok és plazmasejtek képesek-e IL-10 termelésre

- Végül a különböző jelátviteli utak szerepét tanulmányoztuk a B sejtek IL-10 termelésében

2) Ezek után összehasonlítottuk a regulátor B sejtek arányát a rheumatoid arthritisz (RA-s) betegek és egészségesek között:

- Először a regulátor B sejtek százalékos arányát a kontroll mintákban illetve a kiválasztott optimális stimulus hatására.

- Majd a szupresszálo és a gyulladásos citokin profil összehasonlítása következett.

- Ezek után azt vizsgáltuk, hogy az IL-21 eltérően hat-e az RA-s betegekből izolált B sejtek IL-10 termelésre.

- Illetve, hogy van-e funkcionális különbség az egészségesek és az RA-s betegek regulátor B sejtjeinek a helper T sejtek IFN γ termelésére kifejtett gátlásában

3) Végül az anti-TNF biológiai terápia hatását vizsgáltuk a regulátor B sejtekre, illetve más B sejt populációkra:

- Vizsgáltuk az anti-TNF terápia hatását az RA-s betegek regulátor B sejt, memória B sejt, IgM⁺ memória B sejt valamint az aktivált (CD69⁺) memória B sejt populációira.

- ELISA módszerrel vizsgáltuk a szérumban IL-10 szintjének illetve citrullinált peptidekre specifikus ellenanyagok szintjének változását a terápia előrehaladtával.

Módszerek

- Humán sejt izolálás vérből
- ELISA
- ELISpot
- Áramlási citometria (FACS)
- Intracelluláris citokin meghatározás
- Citokin array
- Foszfo-kináz array
- Foszfo-flow

Eredmények

Doktori munkám során megállapítottuk, hogy az általunk alkalmazott stimulusok közül a 48 óráig tartó CpG+CD40L kettős stimulus indukálta a leghatékonyabban a humán regulátor B sejteket, elsősorban a CD27⁺ memória sejtek között.

Az IL-10 termelő regulátor B sejtek csak elenyésző része termel TNF α -t, ezzel szemben nagy részük expresszálja az IL-6-ot egy időben az IL-10-el.

Intracelluláris citokin meghatározás segítségével illetve ELISA módszerrel kimutattuk, hogy az IL-21 szinergisztikusan fokozza a CpG+CD40L mellett a B sejtek IL-10 termelését.

A T és B sejt ko-kultúrával végzett vizsgálataink rávilágítottak, hogy a humán Breg sejtek képesek gátolni a CD4⁺ T sejtek IFN γ termelését.

Intracelluláris IL-10 és Blimp-1 jelölés segítségével megállapítottuk, hogy a plazmasejtek is képesek a reguláló IL-10 termelésére.

Foszfo-flow módszerrel kimutattuk, hogy a p38, az ERK és a STAT3 elengedhetetlen szerepet játszanak a B sejtek IL-10 termelésében.

Az egészséges önkéntesek és az RA-s betegek mintáinak összehasonlítása során megállapítottuk, hogy a 48 órán át tartó CpG+CD40L hatására szignifikánsan kevesebb Breg sejt indukálódott a betegekből származó mintákban és ezek funkcionálisan nem voltak képesek ugyanolyan mértékben gátolni a CD4⁺ T sejtek IFN γ termelését, mint az egészségesekből származó sejtek.

A betegek mintáira jellemző volt, hogy a B sejtek szimultán termelték a reguláló IL-10-et és a gyulladásos TNF α -t, ez

hozzájárulhat a Breg sejtek RA-s betegek esetében megfigyelt csökkent szupresszáló funkciójához.

Ugyanakkor az IL-21 hatására az RA-s betegekből izolált mintákban az egészséges önkéntesekkel azonos mértékben indukálódott a Breg populáció, ami funkcionálisan is ugyanolyan hatékonyan gátolta a $CD4^+$ T sejtek $IFN\gamma$ termelését.

A különböző anti-TNF terápiák hatására az RA-s betegekben a $CD27^+$ memória sejtek aránya nem változott, ugyanakkor csökkent a $CD19^+CD69^+$ aktivált B sejtek aránya.

A terápia előrehaladtával emelkedett az IL-10 termelő regulátor B sejtek aránya.

A szérumban a különböző citrullinált fehérjékre specifikus ellenanyagok illetve az IL-10 szintje nem változott az általunk vizsgált időintervallumban, vagyis a kezelés kezdetét követő 18 hónap alatt.

Diszkusszió

Eredményeink azt mutatják, hogy a 48 órán keresztüli CpG+CD40L kettős stimulus optimális a B sejtek IL-10 termeléséhez, és ezt az IL-21 szinergisztikusan tovább erősíti. Azonosítottuk a CD19⁺CD27⁺ memória B sejteket, mint a humán IL-10⁺ regulátor B sejtek fő forrását. Az RA-s betegekből származó mintákban szignifikánsan kisebb százalékban tudtuk kimutatni a CD19⁺CD27⁺IL-10⁺ B sejteket, mint az egészséges önkéntesekből származókban, illetve ezek kevésbé hatékonyan voltak képesek csökkenteni a CD4⁺ helper T sejtek IFN γ termelését, ebből arra következtettünk, hogy az IL-10 termelő regulátor B sejteknek szerepük lehet az RA kialakulásában.

Az IL-21 hatására nagymértékben emelkedett az IL-10⁺ Breg-ek száma, ezenkívül az IL-21 hatására szignifikánsan megemelkedett az IL-10⁺Blimp-1⁺ plazmabalsztok aránya a B sejtek között.

A jelátviteli utak vizsgálata során kimutattuk, hogy az ERK, a p38 és a CREB aktivációja elengedhetetlenül fontos az IL-10 átíródásában, illetve hogy a STAT3 foszforilációja tovább erősíti a humán B sejtek IL-10 termelését.

Az anti-TNF terápiát kapó RA-s betegek esetében megfigyeltük, hogy hat hónappal a terápia kezdete után szignifikánsan emelkedett a regulátor B sejtek aránya, míg CD69 aktivációs marker expressziója csökkent a B sejtek felszínén. Ezzel szemben a szérumban az IL-10 koncentrációja illetve az általunk vizsgálat citrullinált fehérjék elleni ellenanyagok szintje és specificitása nem változott a terápia előrehaladtával. A terápia hatására megnövekedett regulátor B sejt arány, ugyanakkor a CD69⁺ B sejtek csökkent aránya hozzájárulhatnak az anti-TNF terápia hatékonyságához RA-s betegekben.

Saját közlemények az értekezés témájában

Banko Z, Pozsgay J, Szili D, Toth M, Gati T, Nagy G, Rojkovich B, Sarmay G

Induction and Differentiation of IL-10-Producing Regulatory B Cells from Healthy Blood Donors and Rheumatoid Arthritis Patients.

JOURNAL OF IMMUNOLOGY 2017,

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600218> IF: 4,539

Bankó Zsuzsanna, Pozsgay Judit, Gáti Tamás, Rojkovich Bernadette, Újfalussy Ilona, Sármai Gabriella

Regulatory B cells in rheumatoid arthritis: Alterations in patients receiving anti-TNF therapy.

CLINICAL IMMUNOLOGY 2017,

doi: 10.1016/j.clim.2017.05. IF: 3,557

Egyéb közlemények

Szili D, Cserhalmi M, Banko Z, Nagy G, Szymkowski DE, Sarmay G

Suppression of innate and adaptive B cell activation pathways by antibody coengagement of FcγRIIb and CD19.

MABS 2014, doi: 10.4161/mabs.28841; IF: 5,275

Szili D, Bankó Z, Tóth EA, Nagy G, Rojkovich B, Gáti T, Simon M, Hérincs Z, Sármai G

TGFβ activated kinase 1 (TAK1) at the crossroad of B cell receptor and toll-like receptor 9 signaling pathways in human B cells

PLOS ONE 2014, doi:10.1371/journal.pone.0096381; IF: 3,73